

Aus der Abteilung Tierhygiene I am Lehrstuhl für
Tierhygiene der Universität Hohenheim
Leiter: Prof. Dr. D. Strauch

Eingereicht über das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten
der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Giessen
Direktor: Prof. Dr. Th. Schliesser

**Untersuchungen über einen fluoreszenz-
serologischen Schnelldiagnose von
Bacillus anthracis durch Anwendung der
Mikrokulturtechnik auf nicht fluoreszierenden
Membranfiltern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Giessen

Eingereicht von
Reinhard Böhm
Tierarzt aus Berlin

Giessen 1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung Tierhygiene I am Lehrstuhl für
Tierhygiene der Universität Hohenheim
Leiter: Prof. Dr. D. Strauch

Eingereicht über das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten
der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Giessen
Direktor: Prof. Dr. Th. Schliesser

**Untersuchungen über einen fluoreszenz-
serologischen Schnelldiagnose von
Bacillus anthracis durch Anwendung der
Mikrokulturtechnik auf nicht fluoreszierenden
Membranfiltern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Giessen

Eingereicht von
Reinhard Böhm
Tierarzt aus Berlin

Giessen 1972

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin in Giessen

Dekan: Prof.Dr. G. Lämmler

Berichterstatter: Prof.Dr. D. Strauch

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 7. 1972



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Die Eigenschaften des Milzbranderreger	2
2.2. Milzbranddiagnose	4
2.3. Fluoreszenzserologische Milzbrand- diagnose	7
2.4. Milzbrand in Mikrokulturen	10
2.5. Fluoreszenzserologische Verfahren	11
2.6. Verwendung von nicht fluoreszierenden Membranfiltern	12
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	14
3.1. Material und Methoden	14
3.1.1. Beschreibung der untersuchten Stämme	14
3.1.2. Herstellung des Antigens	17
3.1.3. Immunisierung	18
3.1.4. Gewinnung und Beurteilung der Seren	19
3.1.5. Gewinnung von γ -Globulin	21
3.1.6. Herstellung des Konjugates	22
3.1.7. Prüfung des Konjugates	24
3.1.8. Herstellung der Sporensuspensionen	25
3.1.9. Herstellung der Präparate	27
3.1.10. Beurteilung der Präparate	29
3.2. Ergebnisse	31
3.2.1. Milzbrandstämme	31
3.2.2. Andere aerobe Sporenbildner	32

4.	DISKUSSION	37
4.1.	Fluoreszenz von B.anthraxis	37
4.2.	Aussprossung von B.anthraxis	37
4.3.	Kolonieform von B.anthraxis	38
4.4.	Färbung der anderen aeroben Sporenbildner	39
4.5.	Bemerkungen zum Verfahren	40
5.	ZUSAMMENFASSUNG	43
6.	LITERATURVERZEICHNIS	44
7.	ANHANG	53

1. E I N L E I T U N G

Der Nachweis der Sporen des Milzbrandbazillus, dem Erreger einer der am längsten bekannten Seuchen (5), stellt uns auch heute noch vor Probleme. Ein schneller und einfacher Direktnachweis der Erreger zur Feststellung und Abgrenzung verseuchter Landstriche und Gewässer, insbesondere in außereuropäischen Ländern, oder zur Überprüfung ansteckungsverdächtiger Tierkörpermehle sowie ähnlicher Produkte fehlte bisher.

In dieser Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob die Anwendung von fluoreszierenden Antikörpern in Kombination mit der Mikrokoloniezüchtung für einen Schnellenachweis geeignet ist. Dabei werden spezifische fluoreszenzserologische Reaktionen und die Wachstumsform nach CHADWICK 1963 (12) beurteilt.

Da praktikable Verfahren zur Isolierung der Sporen bereits von CONRADI 1913 (20) und SCHAPLOWA 1966 (61) entwickelt wurden, beschäftigt sich diese Arbeit nur mit dem eigentlichen Nachweisverfahren als Endstufe.

2. L I T E R A T U R

2.1.DIE EIGENSCHAFTEN DES MILZBRANDERREGERS

Bacillus anthracis gehört zur Familie Bacillaceae, FISCHER 1896 (27) und zum Genus Bacillus, COHN 1875 (19) und wird nach BERGEY (4) folgendermaßen beschrieben:

2.1.1.Morphologie: Grampositives, 1 bis 1,3 u dickes und bis 10μ großes unbewegliches Stäbchen. Die zentral oder parazentral liegenden Sporen sind 0,8-1,0 μ mal 1,3-1,5 μ groß. Die Form der Sporangien ist elliptisch oder zylindrisch und der Bakterienleib wird durch sie nicht aufgetrieben.

2.1.2.Wachstumseigenschaften: In der Gelatine-stichkultur erfolgt das Wachstum in Form eines umgekehrten Tannenbaumes. Bei Ausstrichen auf Gelatineplatten entsteht eine große Hydrolysezone. Die Agarkolonien sind groß, stumpf, unregelmäßig und aus parallelen Ketten zusammengesetzt, ähnlich denen von B.cereus. Die Fähigkeiten zur Hämolyse werden als variabel beschrieben. In der Bouillonkultur wächst B.anthraxis mit einer dicken Kahmhaut. Milch wird koaguliert, leicht gesäuert und peptonisiert. Auf der Kaseinplatte entsteht eine weite Hydrolysezone um die Kolonien. Aus folgenden Zuckern, wenn sie im Ammoniumsalz-medium verwendet werden, wird Säure, aber kein Gas produziert: Fructose, Maltose, Trehalose, Dextrose und Saccharose.

Verzögerte und schwache Säurebildung ist aus Glycin und Salicin bei einigen Stämmen zu erwarten. Keine Säure wird aus Arabinose, Rhamnose, Mannit, Galactose, Lactose, Raffinose, Innulin, Dulcitol, Sorbit, Inositol und Adonit gebildet. Stärke wird hydrolysiert und Acetylmethylcarbinol wird produziert.. Eine Reduktion von Nitrat zu Nitrit erfolgt ebenfalls. Für das Wachstum sind bestimmte Aminosäuren notwendig, siehe PURZISS und WHITE 1954 (55), und Lecithinase wird gebildet. Die Bazillen wachsen unter aeroben und fakultativ anaeroben Verhältnissen. Das Temperaturoptimum für das Wachstum liegt bei 35°C, das Maximum ist mit 45°C erreicht. Als wichtigstes Kriterium wird die Pathogenität angeführt. Schon SMITH, GORDON und CLARK 1952 (64) betrachteten den Milzbrandbazillus lediglich als pathogene Variante von *Bacillus cereus*. Als Charakteristische Kolonieform wird von vielen Autoren das Medusenhauptwachstum angeführt. THORNE (66) klärte 1960 den Zusammenhang zwischen R- und S-Form und der CO₂-Spannung. Dabei unterscheidet er 3 Typen: Typ I bildet in vitro bei 10 - 45 %iger CO₂-Spannung eine Kapsel, an der Luft nicht. Die Kolonieform ist unter CO₂-Einfluss glatt und an der Luft rau. Der Keim ist virulent. Typ II ist ein intermediärer Typ und äußerst selten. Er bildet in CO₂ und an der Luft eine Kapsel. Die Kolonieform ist glatt, der Keim ist nicht

virulent. Typ III, die Rauhform, bildet nie eine Kapsel und ist avirulent. Dabei ist zu beachten, daß die meisten Milzbrandstämme dissoziieren, und zwar in vivo in Richtung auf den S-Typ, in vitro in Richtung auf den R-Typ.

2.1.3. Milzbrand als Erkrankung

Bacillus anthracis ist der Erreger der Milzbranderkrankung, die beim Menschen in drei Formen auftritt: Als Hautmilzbrand der pustula maligna, als Lungenmilzbrand der Haderkrankheit und als Magen-Darm-Milzbrand (67). Unter den Tieren erkranken am häufigsten die Wiederkäuer, meist in Form des schnell verlaufenden septikaemischen Milzbrandes. Auch bei Pferd, Schwein und Geflügel tritt die Seuche auf. Dabei erkrankt das Pferd meist unter Kolikerscheinungen und schweren Allgemeinstörungen. Die Krankheitsdauer beträgt 1-8 Tage. Das Schwein und die Fleischfresser erkranken meist nur lokal (62).

2.2. MILZBRANDDIAGNOSE

2.2.1. Entwicklung der Milzbranddiagnose

Die älteste diagnostische Maßnahme beruht auf dem färberischen Nachweis der bekapselten "Bambusformen" der Bakterien im gefallenem oder getöteten Tier und auf der Feststellung der Unbeweglichkeit der Bazillen. Hinzu kommt der Tierversuch zum Beweis der Pathogenität. Dieser kann nach CHARISOW, ABDULLIN und CHAKIMOVA (13) bei gleichzeitiger i.p. Injektion von Salmonellen-Endotoxin wesentlich verkürzt werden.

Als erste serologische und heute noch zur Feststellung des thermostabilen Antigens benutzten Methode führte ASCOLI 1910 (1) die Thermopräzipitation ein.

Ein weiterer wesentlicher Schritt zur Verbesserung der bakteriologischen Differentialdiagnose war die Einführung des Perlschnurtestes durch JENSEN und KLEEMEYER 1954 (35). Die Isolierung des spezifischen Milzbrandphagen durch Mc CLOY 1951 (48) aus *B.cereus* erweiterte die bakteriologischen Nachweismöglichkeiten beträchtlich.

Schließlich zeigten CHERRY und FREEMAN 1959 (15), daß sich fluoreszierende Antikörper auch zum Nachweis von *B.anthraxis* eignen.

Außerdem wird von IVANOVITSCH und FÖLDES 1958 (34) die Prüfung der Phosphatasebildung empfohlen, die bei *B.anthraxis* negativ ist (3). Es wird auch noch die fehlende Lecithinasebildung als Diagnostikum herangezogen (40). Von KUGUMGIEF 1938 (42) wird außerdem die Reduktion von Prontosil als Differentialdiagnostikum empfohlen. Daneben können die mannigfaltigsten biochemischen Reaktionen zur Typenunterscheidung mit benutzt werden, wie JOUBERT und Mitarbeiter 1960 zeigten (38).

Als neueste physikalische Methode schlägt WYATT 1968 (71) das "Light Scattering", ein Verfahren, bei dem die Ablenkung von polarisiertem oder unpolarisiertem Licht an Bakterien gemessen wird, vor. Mit dieser Methode glaubt er, *B.anthraxis* sicher von *B.subtilis*, *E.coli* und *Staphylococcus aureus* unterscheiden zu können. Diese Technik

befindet sich allerdings noch im Experimentalstadium und scheidet im Moment, nicht zuletzt wegen des großen apparativen Aufwandes, für die Routinediagnostik aus.

2.2.2. Kombinierte Methoden

Von verschiedenen Autoren werden kombinierte Methoden zur Milzbranddiagnose empfohlen. SEIDEL (62) schlägt 1962 zur Routinediagnostik die Kombination der folgenden Methoden vor.

- a. Phagentest
- b. Perlschnurtest
- c. Beweglichkeitsprüfung und Beurteilung der Kolonieform
- d. Kontrolle der Phosphatasebildung
- e. Nachweis der Lecithinasebildung

SCHAPLOWA (61) empfiehlt 1964 folgendes:

- a. Mäuseinfektion mit anschließender Überprüfung des Peritonealexsudates auf verkapselte Bazillen.
- b. Ascolipräzipitation mit den Versuchstierorganen.
- c. Gelatine-Stichkultur
- d. Peptonisierung von Milch

SLJACHOW und GRUZ (63) vertreten 1966 folgende Kombination:

- a. Nachweis der Kapselbildung auf Spezialnährböden
- b. Phagentest
- c. Perschnurtest

1966 schlägt SOKOL (65) zur Erkennung virulenter Milzbrandstämme folgenden Untersuchungsgang vor:

- a. Perlschnurtest
 - b. Phagentest
 - c. Intraperitonealinfection von Mäusen
 - d. Wachstumsbeurteilung auf Spezialnährböden
- BRACHMAN und PEELEY 1970 (8) halten eine Kombination der fluoreszierenden Antikörpermethode mit kulturellen Untersuchungen für notwendig, wobei die Koloniemorphologie, die biochemischen Eigenschaften, die Beweglichkeit, die Kapselbildung auf Bicarbonatagar unter CO_2 -Spannung, der Perlschnurtest, der Tierversuch und der Gamma-Phagentest, nach BROWN und CHERRY 1955 (9) zur endgültigen Diagnose herangezogen werden.

2.3.FLUORESZENZSEROLOGISCHE MILZBRANDDIAGNOSE

Obwohl LEVINA 1958 (44) schon fluoreszierende Antikörper zur Milzbranddiagnose herangezogen hat, ist es bis heute noch nicht gelungen, dieses Verfahren zur fehlerfreien Diagnosemöglichkeit auszubauen.

Schon 1959 stellten CHERRY und FREEMAN (15) fest, daß sowohl *B. cereus* als auch *B. megaterium* von Milzbrandkonjugaten angefärbt werden.

Versuche, diese Unspezifität durch Absorption mit heterologen Bakterien zu beseitigen, zeigten, daß *B. cereus* und *B. megaterium*, die zur Absorption verwendet wurden, zwar die unspezifische Fluoreszenz verhinderten, aber auch die spezifische Färbung fast zum Erlöschen brachten.

CHERRY und FREEMAN verwendeten ein Serum, das mittels bekapselter und unbekapselter vegetativer Formen im Gemisch mit Sporen als Antigen hergestellt wurde. CHERRY, GOLDMAN und CARSKI (16) bestätigten 1960 diese Befunde und teilten ferner mit, daß das von HANSEN (36) verwendete

Antisporienkonjugat ebenfalls nicht spezifisch ist. 1965 fügten CHERRY und MOODY (17) hinzu, daß auch einige Stämme von *B. subtilis* mitgefärbt werden.

Die praktische Anwendbarkeit der Methode untersuchten 1961 BIEGELEISEN, CHERRY, SKALLY und MOODY (17) . Sie versuchten, *B. anthracis* aus Ziegenhaaren, Staub, Fußbodenabwaschungen und Abwasser eines Tierhaare verarbeitenden Betriebes nachzuweisen. Die Keime wurden dabei den ersten angezüchteten Kolonien entnommen oder stammten aus den mit den Proben infizierten Mäusen. Die Autoren beobachteten wiederum die Mitfärbung von *B. megaterium*.

BIEGELEISEN benutzte 1964 (7) ebenfalls die Methode von CHERRY und FREEMAN, um Milzbrandbazillen im Trockenfleisch einer Indianerreservation nachzuweisen. Auch in seiner Arbeit fehlt der Hinweis auf die Mitfluoreszenz anderer aerober Sporenbildner nicht.

In Europa berichtet KAMPELMACHER (39) 1960 von der Signifikanz der direkten und indirekten Methodik der fluoreszierenden Antikörper.

Seine Arbeiten bewegen sich auf der Basis der Methodik von CHERRY und FREEMAN. Ihn stört ebenfalls die Mitfluoreszenz anderer Bakterien der Gattung *Bacillus*.

Andere Untersucher benutzen auch ein gegen gekapselte Milzbrandbazillen gerichtetes Serum.

FRANEK (29) beschreibt 1965 eine Methode zum Nachweis von Milzbrandbazillen mittels fluoreszierender Antikörper in infizierten Mäusen nach 18-24 Stunden. Zum Nachweis kleiner Bakterienmengen empfiehlt er, die Mäuse mit Cortison vorzubehandeln.

1967 untersuchen FRANEK und KUBIN (30) das antikapsuläre Serum genauer und stellen fest, daß es gegen verschiedene Komponenten der Kapsel und der Bakterienwand gerichtet ist und mit ihnen in verschiedenen Wachstumsperioden unterschiedlich reagiert.

Im gleichen Jahr erweitern KUBIN und FRANEK ihre Arbeiten (41) dahingehend, daß sie Versuchstieren Eidotter mit Sporen injizieren, um so zu einem schnellen Nachweis zu kommen. Die Nachweiszeit liegt zwischen 13 und 23 Stunden. Außerdem stellen sie fest, daß die Milzbrandkapsel in einem späteren Wachstumsabschnitt die Fähigkeit verliert, mit fluoreszierenden Antikörpern zu reagieren.

Auf russischer Seite beschäftigt sich nach LEVINA SARWARSIN 1963 (60) mit der Möglichkeit des fluoreszenzserologischen Milzbrandbazillennachweises. Er benutzt Membranfilter zur Anreicherung der Sporen und benötigt 72 Stunden für den Nachweis.

BUSYGIN (10) behauptet, mittels eines konjugierten Vollserums *B.anthraxis* von *B.subtilis*, *B.mesentericus* und *B.megaterium* sicher unterscheiden zu können.

KUZMIN stellt 1968 (43) mit der indirekten FA-Methode fest, daß sich *B.anthraxis*, *B.pseudoanthracis*, *B.cereus*, *B.mesentericus*, *B.subtilis*, *B.megaterium* und *B.mycoides* gut voneinander unterscheiden lassen. Der Autor meint, daß sich 3-4 h alte Kulturen nur mit der indirekten Methode färben lassen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß folgende Seren nachstehende Ergebnisse zeigten:

TABELLE I

AUTOR	ANTIGEN bzw. ANTISERUM	MITFLUORESZENZ	TIERPASSAGE
Levina	präzipitierendes	-	-
Cherry u. Freeman	verkapselter NC 804 Stamm	B.cereus B.megaterium	-
Cherry u. Moody	"	B.cereus B.megaterium B.subtilis	
Biegel- eisen u. Cherry	"	B.megaterium	ja
Biegel- eisen	"	andere aerobe Sporenbildner	-
Franek u. Kubin	verkapselte Stämme	-	ja
Sawarsin	keine Angabe	keine Angabe	-
Busygin	Vollserum	keine (sichere Unterscheidung von: B.anthracoïdes, B.megaterium, B.sub- tilis, B.mesentericus)	-
Kuzmin	keine Angabe	keine (sichere Unterscheidung von: B.anthracoïdes, B.cereus, B.megaterium, B.mesentericus B.subtilis)	-

2.4. MILZBRAND IN MIKROKULTUREN

Nachdem FORTNER 1929 (28) die Deckglaskultur als mikrobiologische Methode eingeführt hatte, erprobte ULBRICH 1954 (68) dieses Verfahren unter anderem auch für Milzbrand. Er beschreibt das Wachstum der aus einer Spore entstandenen Mikrokolonie über die Dauer von 4 Tagen. 1957 beobachtete er mittels dieser Methodik die Dissoziation von Milzbrandbazillen auf Fuchsinagar in S- und R-Formen (69).

PITZURRA untersucht mit der von ihm 1954 beschriebenen Methode (53) die Sporulation von *B.subtilis* und *B.anthraxis* in Mikrokulturen.

CHADWICK 1963 (12) benutzt die Mikrokolonie auf Casein-Yeast-Lactate-Glucose-Agar (CYLG) als Differentialdiagnostikum zwischen *B.anthraxis* und anderen aeroben Sporenbildnern. Er stellt fest, daß Milzbrandbazillen in den ersten 3-4 Stunden gradlinig zu Ketten aussprossen, die sich dabei zentral zu Schleifen zusammenlegen. Andere Aerobe Sporenbildner sprossen so aus, daß sie von Anfang an schleifenförmig zusammengelegte Ketten oder kompakte Kolonien bilden.

2.5.FLUORESZENZSEROLOGISCHE VERFAHREN

Seit den grundlegenden Arbeiten von COONS, CREECH und JONES 1941 (21) sind über 30 Jahre vergangen. Eine Fülle von Variationen der Methodik ist im Laufe der Zeit von verschiedenen Autoren beschrieben worden. Deshalb sollen an dieser Stelle nur die prinzipiellen Arbeitsweisen erwähnt werden.

Die drei gebräuchlichsten Fluoreszenzfarbstoffe sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Rhodamin B 200 (RB 200) und 1-Dimethylamino-Naphtalin-5-Sulphonsäure (DANS) - (54).

Das Maximum der Fluoreszenzemission liegt für FITC bei 520 nm, für RB 200 bei 595 und 710 nm und für DANS bei 525 nm (49). Da in der vorliegenden Arbeit nur FITC-Konjugate verwendet werden, sollen nur die zur Zeit praktizierten Hauptkonjugationsverfahren für diesen Farbstoff geschildert werden.

Einmal kann das Dialyseverfahren verwendet werden. Diese Methode wurde 1963 von CLARK und SHEPARD (18) eingeführt. Bei diesem Verfahren wird das FITC in einer Carbonat-Bicarbonat-Pufferlösung, pH 9, im Verhältnis von 0,1 mg/ml aufgelöst. Die äquilibrierte 1%ige Gammaglobulinlösung wird in einen Dialyseschlauch gegeben und in den Farbstoff hineingehängt. Die Konjugation dauert zwischen 16 und 24 Stunden bei 4°C.

Die zweite Möglichkeit besteht darin, daß man den Farbstoff, in Puffer aufgelöst oder als kristalline Substanz, direkt in die Globulinlösung, pH 9-9,5, bringt, wie es von MARSHALL 1958 und Mitarbeitern beschrieben wird (47).

Weniger gebräuchlich ist die Filterpapiermethode von GOLDMAN und CARVER 1957 (31) und die Schnellkopplungsmethode nach REISHER 1968 (56).

Zur Reinigung der Rohkonjugate wird heute die Gelfiltration über Sephadex⁺ verwendet, die die unbefriedigende Dialyse ersetzt hat (32).

Zur Beseitigung der unspezifischen Fluoreszenz werden die heterologe Absorption, die Behandlung mit Organpulver (22) und die Ionenaustauscherchromatografie mit DEAE-Zellulose nach RIGGS und Mitarbeitern 1960 (58) empfohlen.

2.6. VERWENDUNG VON NICHT FLUORESZIERENDEN MEMBRANFILTERN

Die Methodik des direkten Nachweises von Bakterien auf nicht fluoreszierenden Membranfiltern mittels fluoreszierender Antikörper wurde 1965 von DANIELSON (23) beschrieben.

+ Deutsche Pharmacia, Frankfurt/M.

Nachgewiesen wurden *E.coli* und *Shigella* guanabara. In einer weiteren Arbeit schildern DANIELSON und LAURELL (24) die Anwendung der Methode zum Nachweis kleiner Bakterienmengen im Wasser. Dieses Verfahren wurde 1969 von GUTHRIE (33) zum quantitativen Nachweis von *E.coli* im Wasser ausgebaut. Den ersten Hinweis auf die Verwendungsmöglichkeit von nicht fluoreszierenden Membranfiltern in Verbindung mit der Mikrokoloniezüchtung findet man 1958 bei CARTER und LEISE (11). Somit bildet dieser Hinweis die Grundlage für die Arbeiten von DANIELSON und auch für die hier durchgeführten Untersuchungen.

3.E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

3.1.MATERIAL UND METHODEN

3.1.1.Beschreibung der untersuchten Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren an 20 Milzbrandstämmen und an 21 Stämmen anderer aerober Sporenbildner getestet.

3.1.1.1.Milzbrandstämme

Wie aus Tabelle II zu entnehmen ist, wurden die Stämme mit laufenden Nummern versehen, die während der gesamten Versuchsdurchführung beibehalten wurden.

Nr.1 Impfstamm Sterne,Herkunft: Behringwerke,
Marburg

Nr.2 NPR-Vollum-Stamm,Herkunft: American Type Culture
Collection (ATCC)

Nr.3-12 Herkunft: Bundesgesundheitsamt Berlin (BGA)

Nr.13 Impfstamm Stamatin,Herkunft: Institut für Tier-
hygiene,Kosice.

Nr.14-16 Herkunft: Centre International de Distribution
de Souches et d'Information sur
les Types Microbiens,Lausanne.

Nr.17 Wildstamm, isoliert aus einer Kuh, Herkunft:
Institut für Tierhygiene,Kosice.

Nr.18 Wildstamm, isoliert aus einem Schwein.

Nr.19 Wildstamm, isoliert aus einer Kuh.

Nr.20 Wildstamm, isoliert aus einem Rind.

Die Stämme mit den Nummern 18-20 stammen aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie der Justus-Liebig-Universität, Giessen.

Alle verwendeten Milzbrandstämme zeigten einen positiven Perlschnurtest und wurden von dem γ -Phagen gelöst.

3.1.1.2. Andere Aerobe Sporenbildner

Die anderen aeroben Sporenbildner tragen vor der Nummer ein B. Nr. B1 und B2 entstammen der diagnostischen Sammlung des Institutes für Vet. Bakteriologie der Universität Bern. Die Stämme, die die Bezeichnung LA, CCM oder CCEB vor der Nummer tragen, sind über die internationale Stammsammlung in Lausanne bezogen worden.

TABELLE II

A.DIE VERWENDETEN MILZBRANDSTÄMME

Laufende Nummer	Bezeichnung	S oder R Form
1	"Sterne"	R
2	ATCC 14185	R
3	UD III/7	R
4	M 10	S
5	"Wien"	S
6	"Münster"	S
7	BGA 2	S
8	BGA 3	S
9	BGA 5	S
10	BGA 6	S
11	BGA 7	S
12	BGA 8	S
13	"Stammatin"	R
14	LA 896	S
15	LA 251	S
16	LA 252	S
17	TN	S
18	12VP 166	S
19	41.FL 973	S
20	43.FL 2007	S

B.DIE VERWENDETEN ANDEREN AEROBEN SPORENBILDNER

Laufende Nummer	Bezeichnung	Art
B 1	-----	B.cereus
B 2	-----	B.cereus
B 3	ATCC 9634	B.cereus
B 4	LA 925	B.cereus
B 5	ATCC 14581	B.megaterium
B 6	LA 265	B.megaterium
B 7	BGA 20	B.subtilis
B 8	BGA 21	B.subtilis
B 9	LA 268	B.subtilis
B10	CCEB 642	B.subtilis
B11	CCEB 623	B.badius
B12	LA 2462	B.pumilus
B13	CCM 831	B.laterosporus
B14	CCM 2049	B.pantothenicus
B15	CCM 1460	B.polymyxa
B16	CCM 2181	B.licheniformis
B17	CCM 2012	B.macerans
B18	CCEB 631	B.coagulans
B19	CCEB 626	B.circulans
B20	CCM 35	B.lentus
B21	CCEB 627	B.firmus

3.1.2. Herstellung des Antigens

3.1.2.1. Kultivierung und Reinigung

Als Kulturmedium diente Tryptic Soy Bouillon⁺ (TSB), die zu 50 ml in 100 ml Steilbrustflaschen abgefüllt worden war. Diese wurden mit einer 15-stündigen Kultur des NP-1/R Vollumstammes, ATCC 14185 beimpft. Der Ansatz wurde dann für die Dauer von 5 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln auf dem Schüttelapparat⁺⁺ bebrütet. Danach erfolgte die Abtötung der Kultur mit sauber filtriertem Formalin bei einer Endkonzentration von 5 %. Nach 5 Minuten Abtötungszeit wurde die Suspension in sterile Zentrifugenbecher abgefüllt und bei 1700g 20 Minuten zentrifugiert.⁺⁺⁺ Das Sediment wurde fünfmal mit 0,14M Kochsalzlösung gewaschen.

3.1.2.2. Standardisierung des Antigens

Nach Beendigung des Waschvorganges erfolgte die Umfüllung der Bakteriensuspension in eine sterile Rundküvette. Bei 560nm wurde die Dichte der Suspension im Photometer⁺⁺⁺⁺ auf eine Absorption von 70 % eingestellt. Auf eine direkte Keimzählung in der Zählkammer oder im Ausplattungsverfahren mit Verdünnungsreihen wurde verzichtet, weil B.anthraxis in der Bouillon in langen, fest zusammenhaltenden Ketten wächst, und so mit diesen Methoden keine eindeutige Zahlenermittlung möglich ist.

+ Difco, Otto Nordwald, Hamburg

++ Köttermann, Hänigsen bei Hannover

+++ Stock, Marburg

++++Lange, Berlin, Typ: Medico

3.1.2.3. Kontrolle des Antigens

Nachdem das Antigen in gebrauchsfertige Form gebracht worden war, wurde die Suspension in jeweils fünf Ausspatelungen von 0,1 ml auf Hammelblutplatten auf ihre Sterilität geprüft. Die optische Reinheitskontrolle erfolgte durch die Anfärbung zweier Objektträgerausstriche nach RAKETTE (59). Auf diese Art und Weise sollte das mögliche Vorhandensein von Sporen ausgeschlossen werden.

3.1.3. Immunisierung

3.1.3.1. Auswahl der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Kaninchen aus konventioneller Zucht verwandt und zwar die schwarzen Varianten der Rasse "Deutsche Riesenschecken." Die Immunisationsdauer betrug 8 Wochen.

3.1.3.2. Immunisierungsmethode

Die Tiere wurden in der von CHASE 1967 (14) angegebenen Methode nach AMIES 1959 (2) mit Kalziumalginat⁺ als Adjuvans immunisiert. Die Injektionen erfolgten in wöchentlichen Anständen wechselseitig in die Oberschenkelmuskulatur. Die Antigenmenge wurde von 0,5 ml der oben beschriebenen Suspension bis auf 2 ml gesteigert. Die Steigerung erfolgte in 0,5 ml Schritten, wobei zweimal hintereinander die gleiche Menge gespritzt wurde, einmal auf der rechten und einmal auf der linken Seite. Das Mischungsverhältnis mit dem Alginat betrug 1 : 1. Die Antigen-suspension wurde vor jeder Immunisierung frisch zubereitet und sofort verwendet.

+ Medical Alginates Ltd., Perivale, Greenford, England

Das geschah, weil JOST 1970 (37) schon nach 24 Stunden Veränderungen in der Gramfärbbarkeit aerober Sporenbildner, die abgetötet waren, festgestellt hatte. Um die Eventualität einer daraus resultierenden Zellwandveränderung auszuschließen, wurde der oben beschriebene Weg gewählt.

Bei den zwei letzten Immunisierungen wurde eine Titerkontrolle vorgenommen und eine Woche nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet.

3.1.4. Gewinnung und Beurteilung der Seren

3.1.4.1. Entbluten der Kaninchen

Die Kaninchen wurden unter Nembutalnarkose⁺ durch die Karotis entblutet. Die festen Blutbestandteile wurden abzentrifugiert und das Serum wurde durch eine Seitz-EKS-Schicht filtriert. Die Aufbewahrung erfolgte in Portionen zu 20 ml bei -20°C.

3.1.4.2. Durchführung der Agglutination

Zur Feststellung des Gehaltes an agglutinierenden Antikörpern wurde die Agglutination wie folgt durchgeführt:

3.1.4.2.1. Vorbereitung des Antigens

Da die vegetativen Anteile von B.anthraxis, wie die anderer aerober Sporenbildner auch, zur Spontanagglutination neigen (54), ist eine Vorbehandlung des Antigens notwendig. Das Antigen wurde wie oben beschrieben hergestellt. Dann wurde die im Photometer auf eine Absorption von 80 % eingestellte Bakteriensuspension in ein Kölbchen mit 2 ml

+ Abbott S.A.; Vertrieb: WDT, Hannover

Fassungsvermögen gegeben. Dieses Kölbchen kam in ein Eiswasserbad und wurde mit Ultraschall⁺ behandelt. Dabei kam die Mikrospritze zur Verwendung und die Zellen wurden bei Stufe 5 für die Dauer von 5-10 Minuten beschallt. Bei dem gewünschten Zerkleinerungsgrad blieb die Suspension schlierenfrei. Die auf diese Art und Weise zerkleinerten Bakterienzellen und Ketten zeigten, wie aus Kontrolluntersuchungen hervorging, keine Neigung zur Autoagglutination.

3.1.4.2.2. Durchführung der Agglutination

Zur Herstellung der Verdünnungsreihen für die Agglutination wurde 5 %ige Kochsalzlösung verwendet. Es wurden Verdünnungen des Serums von 1 : 20 bis 1 : 5120 erstellt. In jeder Versuchsreihe lief das Serum eines nicht immunisierten Kaninchens als Kontrolle mit. Zu jeder Verdünnungsstufe und zur Kontrolle kam ein Tropfen der jeweils frisch hergestellten Antigenzubereitung aus der Pasteurpipette.⁺⁺ Die Ablesung der über Nacht bei 37°C bebrüteten Reihen erfolgte unabhängig durch zwei Personen. Für die Herstellung der Konjugate wurden nur Seren mit einem Titer von 1 : 2560 verwendet.

+ Branson Super Sonic Sonifier, B 12

++ WU, Mainz; Pasteur Capillary Pipettes, 230 mm

TABELLE III

ERGEBNISSE DER IMMUNISIERUNG NR. 7

Datum	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	Kontr.
18.V.	+	+	+	+	+	+	-	-	-
18.5.	+	+	+	+	+	±	-	-	-
25.V.	+	+	+	+	+	+	+	-	-
25.V.	+	+	+	+	+	+	±	-	-
8.VI.	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8.VI.	+	+	+	+	+	+	+	-	-

3.1.5. Gewinnung von γ -Globulin

3.1.5.1. Ausfällen des γ -Globulins

Zum Ausfällen des γ -Globulins aus dem Serum wurde Ammoniumsulfat verwendet, in Anlehnung an die Methode von COONS 1950 (22).

20 ml Serum wurden mit 10 ml 0,1M phosphatgepufferter 0,14M Kochsalzlösung (PBS) versetzt und auf 4°C gehalten. Dazu wurden tropfenweise und unter ständigem Rühren 60 ml einer 3,0M Ammoniumsulfatlösung hinzugegeben. Somit erfolgte eine Ausfällung bei 2,0M Ammoniumsulfatkonzentration. Unter ständigem Rühren blieb der Ansatz dann fünf Stunden bei 4°C stehen und wurde zentrifugiert. Dieses Sediment wurde dann zweimal mit 1,60M Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Danach wurde es in insgesamt 4 ml 0,01M PBS, pH 8, aufgelöst und über Nacht bei 4°C gegen 0,01M PBS dialysiert.

3.1.5.2.Überprüfung des γ -Globulins

Nachdem mit 1%iger Bariumchloridlösung überprüft worden war, ob das Dialysat frei von Sulfationen ist, wurde es weiter untersucht. Die Eiweißkonzentration wurde mittels der Biuretreaktion⁺ photometrisch bestimmt. Die Reinheit der Lösung wurde mittels Acetatfolienelektrophorese⁺⁺ überprüft.

3.1.6.Herstellung des Konjugates

3.1.6.1.Konjugation mit FITC

Die Konjugation der γ -Globulinfraktion erfolgte in der von FEY 1970 (25) angegebenen Art und Weise. Die Eiweißlösung wurde mit 0,14 M Kochsalzlösung auf einen Proteingehalt von 2 % eingestellt und der pH-Wert mit 0,5 M Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,7, auf 9-9,3 justiert. In ein kleines Glasgefäß wurde kristallines FITC⁺⁺⁺ eingewogen, und zwar in einer Menge von 1 mg auf 100 mg Globulin. In das Gefäß kam ein Rührmagnet und auf dem Magnetrührer wurde unter ständigem heftigem Rühren die Globulinlösung dazugestürzt. Dieser Ansatz wurde bei 4°C über 16 Stunden gerührt.

+ Merckotest, E. Merck AG, Darmstadt

++ Beckmann Mikrozone, Auswertung: Analytrol R102

+++ E. Merck AG, Darmstadt

3.1.6.2. Reinigung des Rohkonjugates

Zunächst wurde der überflüssige Farbstoff abzentrifugiert. Der restliche ungebundene Farbstoff wurde durch Gel-filtration über Sephadex G50 coarse⁺ nach GORDON und Mitarbeiter (32) entfernt. Als Elutionsflüssigkeit diente 0,02 M Phosphatpuffer, pH 8. Die Proben wurden im Fraktionssammler⁺⁺ gesammelt.

Zur Beseitigung der unspezifischen Fluoreszenz wurde das Konjugat durch Ionenaustauscherchromatographie über DEAE-Zellulose nach RIGGS und Mitarbeitern 1960 (58) von den über- und unterkonjugierten Bestandteilen gereinigt.

3.1.6.2.1. Präparierung der DEAE-Zellulose

Es wurde Whatman Zellulose ⁺⁺⁺ DE 52, mikrogranular form, fully swollen, verwendet. Entsprechend den Vorschriften des Herstellers, wurde diese mit 0,02 M Phosphatpuffer, pH 8, äquilibriert und so auf einen pH-Wert von 8,0 gebracht. Nach Einfüllung in eine Chromatographiesäule wurde die Fraktionierung in folgenden Stufen vorgenommen:

- | | | | | | | |
|----|----------------|---------|------|---|--------|------|
| 1. | Phosphatpuffer | 0,02 M, | pH 8 | + | ----- | NaCl |
| 2. | " | " | " | + | 0,03 M | " |
| 3. | " | " | " | + | 0,14 M | " |
| 4. | " | " | " | + | 0,28 M | " |

Das Eluat wurde im Fraktionssammler gesammelt und von den beiden Fraktionen mit dem ionenstärksten Elutionsmittel wurden die Anteile mit der kräftigsten Färbung für den Versuch ausgewählt.

+ Deutsche Pharmacia G.m.b.H., Frankfurt/M.

++ Fraktomat Y-3; Haiss KG, Jungingen

+++ Vetter und Hormuth, Heidelberg

3.1.7. Prüfung des Konjugates

Die Spezifität der Konjugate wurde wie folgt geprüft: Es wurden gewaschene Bakterien-suspensionen des Referenzstammes und von *B. cereus* in der vorher beschriebenen Art und Weise hergestellt. Davon wurde ein Tropfen wie beim Blutaussstrich auf einem entfetteten Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und in Aceton fixiert. Es wurden zwei Präparate vom Referenzstamm und eines von *B. cereus* hergestellt. Der erste Ausstrich von *B. anthracis* wurde unbehandelt mit Konjugat überschichtet. Auf den zweiten Ausstrich wurde unmarkiertes Milzbrandserum aufgebracht. Der Ansatz wurde dann 12 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37°C bebrütet. Nach einer gründlichen Spülung in 0,02 M PBS, pH 8, wurde auch dieser mit Konjugat überschichtet. Der Ausstrich von *B. cereus* wurde ebenfalls sofort fluoreszenzserologisch angefärbt.

Die mit Konjugat versehenen Ausstriche kamen für 30 Minuten in eine feuchte Kammer und wurden anschließend für eine weitere halbe Stunde im mehrmals gewechselten 0,02 M PBS, pH 8, gespült. Die Betrachtung der Präparate erfolgte fluoreszenzmikroskopisch⁺ im Dunkelfeld (Lampe: HBO 200, Erregerfilter: BG 12, Sperrfilter: 53 und 44). Es wurden nur Konjugate verwendet, bei denen der homologe absorbierte Ausstrich keine Fluoreszenz zeigte und der heterologe Ausstrich nicht oder kaum wahrnehmbar fluores-

+ Carl Zeiss, Oberkochen, Forschungsmikroskop Universal

zierte. Die Konjugate wurden stets unverdünnt verwendet.

3.1.8. Herstellung der Sporensuspensionen

3.1.8.1. Gewinnung der Sporen

Von den zu untersuchenden Stämmen, siehe 3.1.1.1., wurde jeweils 1 ml einer 6-Stunden-Kultur in TSB auf 0,01%igem Mangansulfatagar nach WALKER und BATTY 1965 (70) ausgespatelt und 7-14 Tage bebrütet. Der Grad der Sporenbildung wurde in der zweiten Woche jeden zweiten Tag im nach RAKETTE gefärbten Ausstrich überprüft und durch Auszählung des Gesichtsfeldes bei 640 facher Vergrößerung beurteilt.

Bei einer Versporung von 80 - 90 % wurden die Platten mit sterilem, destilliertem Wasser abgeschwemmt. Das Abgeschwemmte wurde zentrifugiert und in destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde es durch eine fünffache Lage steriler Gaze gefiltert und noch zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Abtötung der vegetativen Anteile erfolgte eine Erhitzung auf 80°C für 45 Minuten.

3.1.8.2. Reinigung der Suspension

Zur Reinigung der Sporen von den vegetativen Anteilen wurde das folgende Verfahren benutzt, das auf der Methode von CONRADI 1913 (20) basiert. Die Suspensionen wurden mit einem Drittel des Volumens Petroläther⁺ aufgeschüttelt

+ Merck AG, Darmstadt

und in ein möglichst breites Zentrifugenglas gegeben. Für 15 Minuten wurden sie mit 900 g zentrifugiert. Dabei blieb der stark sporenhaltige Teil an der Petroläther-Wasser-Grenzschicht hängen, während der Rest als Sediment zu finden war. Der Petroläther und die Petroläther-Wasser-Grenzschicht wurden vorsichtig abgesaugt und durch steriles Phasentrennpapier⁺ gegeben. Nachdem so der Petroläther von der geringen Wassermenge der Grenzschicht abgetrennt worden war, konnte diese abgesaugt werden. Die an den Filterinnenwänden haftenden Sporen wurden mit sterilem destilliertem Wasser abgespült und die Flüssigkeit zu dem abgesaugten Material gegeben. Wenn noch geringe Petroläthermengen in den Proben waren, wurden diese im Wasserbad bei 80°C abgedampft. Danach wurden die Proben zentrifugiert und das Sediment dreimal gewaschen. Die Suspension wurde auf einen Gehalt von 10^4 - 10^5 lebende Sporen pro Milliliter eingestellt. (Abb.2) Alle diese Verfahrensschritte wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt. Die Sporenzählung erfolgte im Oberflächenverfahren auf Nähragar⁺⁺. Die Aufbewahrung der Suspensionen erfolgte bei 4°C im Kühlschrank. Vor jedem Versuch wurden die Lebensfähigkeit der Sporen und die Reinheit der Suspension durch Ausstriche auf Schafblutagar überprüft.

+ Whatman, Hormuth & Vetter, Heidelberg

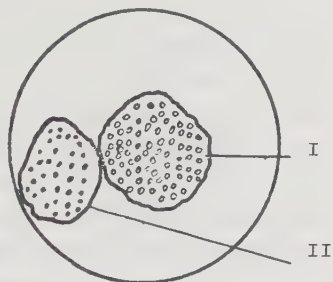
++ Merck AG, Darmstadt

3.1.9. Herstellung der Präparate

3.1.9.1. Anfertigen der Ausstriche

Als Keimträger dienten fluoreszenzfreie Filter ($\emptyset$ 13 mm) mit Gitteraufdruck⁺, die mit dem Aufdruck nach unten auf 8%igen Schafblutagar⁺⁺ gelegt wurden. Danach erfolgte mit einer feinen Öse ($\emptyset$ 1 mm) das Aufbringen der zu untersuchenden Sporensuspension in der Mitte des Filters.

Exzentrisch wurde dann in der nebenabgebildeten Weise die gleiche Sporenmenge des Referenzstammes aufgebracht. Von jedem Stamm wurden zwei Präparate angesetzt und im Brutschrank bei 37°C bebrütet. Nach 4 Stunden wurde die erste und nach 5 Stunden die zweite Serie entnommen.



I zu untersuchende Probe
II Referenzstamm

3.1.9.2. Fixation

Nach der Bebrütung wurden die Filter auf saugfähiges Papier gelegt und unter der UV-Lampe für 10 Minuten getrocknet. Dann wurden sie einzeln auf den Filterhalter gelegt und durch Durchsaugen einiger Tropfen Fixationslösung kurz vorfixiert. Die Nachfixation erfolgte durch Einlegen der Filter in die Fixationslösung für 10 Minuten. Den Empfehlungen von LOVELOCK

+ Millipore, Neu Isenburg, Typ: HABG01300

++ Blood agar base: Oxoid, Wesel

und DAVIES 1967 (45) folgend, wurde zur Fixation eine 5%ige Formalinlösung in 0,02 M PBS, pH 8, verwendet. Danach wurden die Filter in 0,01 M PBS, pH 8, gespült und nach kurzem Abtrocknen auf einer saugfähigen Unterlage auf Objektträger gelegt.

3.1.9.3. Anfärben der Präparate

Die Objektträger mit den aufgelegten Filtern wurden mit reichlich Konjugat überschichtet und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C bebrütet. Das überschüssige Konjugat wurde dann abgegossen und die Filter unter dreimaligem Wechsel der Spülflüssigkeit (0,01 M PBS, pH 8,0) abgewaschen. Im letzten Bad verblieben die Filter für 15 Minuten.

3.1.9.4. Eindecken der Präparate

Die gespülten Filter wurden auf saugfähigem Papier abgetrocknet und auf die Objektträger gelegt. Danach wurden zwei Tropfen fluoreszenzfreies Glycerin⁺, dem 20 % 0,02 M PBS, pH 8, zugesetzt worden waren, aufgeträufelt. Das Präparat wurde mit einem großen Deckglas unter Vermeidung von Luftblasenbildung abgedeckt.

+ Merck AG, Darmstadt

3.1.10. Beurteilung der Präparate

Die Beurteilung der Präparate erfolgt sofort nach der Fertigstellung.

3.1.10.1. Mikroskopische Ausrüstung

Es wurde die Auflichteinrichtung des Fluoreszenzmikroskopes verwendet⁺. Als Primärfilter dienten BG 12 und als Sekundärfilter die Filter 53 und 44. Die Beurteilung der Präparate erfolgte bei fünfhundertfacher Vergrößerung. Zur Auswertung und Photographie wurde anstelle der üblichen HBO 200 Lampe eine CSI 250-Lampe verwendet, um ein Ausblassen der Präparate zu vermeiden und eine bessere Kontrastierung zu erreichen. Die Belichtungszeit⁺⁺ beim 31 DIN Film betrug je nach Helligkeit des Präparates zwischen drei und vier Minuten.

3.1.10.2. Auswertung des Präparates

Alle Präparate wurden im Vergleich zum Referenzstamm ausgewertet.

3.1.10.2.1. Bewertung der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz des Referenzstammes wurde mit +++ bewertet.

Etwas schwächere Fluoreszenz erhielt die Wertung ++

Weitaus schwächere Fluoreszenz, aber mit deutlich erkennbaren Bakterienkonturen, wurde mit + beurteilt.

Unspezifische Fluoreszenz, keine Konturen erkennbar, aber deutliche Sporenfärbung bekam die Wertung -

+ Zeiss, Auflichtkondensor II FL

++ AGFAPAN 1000 Agfa-Gaevert, Leverkusen

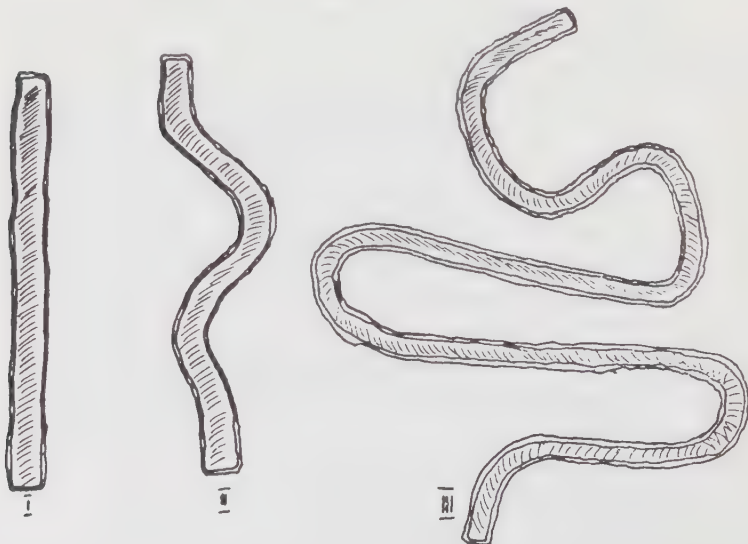
Wenn keine unspezifische Fluoreszenz vorlag und nur die Sporen schwach gefärbt waren, wurde das Präparat mit -- beurteilt. Wenn keine Fluoreszenz auftrat, lautete die Beurteilung ---

3.1.10.2.2. Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit

Gleiche Wachstumsgeschwindigkeit wie der Referenzstamm $\pm$
Schnelleres Wachstum als der Referenzstamm +
Langsameres Wachstum als der Referenzstamm -

3.1.10.2.3. Beschreibung der Aussprossungsform

Die typische Aussprossungsform (12) ist bei Wachstum nach 4 Stunden gerade, bzw. mit leichter Schleifenbildung zentral. Nach 5 Stunden stellte sich eine mehr oder weniger starke Schleifenbildung ein, die in manchen Fällen eine exakte Beurteilung unmöglich machte. Alle abweichenden Kolonieförmungen galten als atypisch.



I + II: "Gerades" Wachstum - III: Schleifenbildung

3.2. ERGEBNISSE

Die Einzelergebnisse sind den nachstehenden Tabellen zu entnehmen.

3.2.1. Milzbrandstämme

3.2.1.1. Beurteilung der Fluoreszenz

Es traten Intensitätsunterschiede in der Fluoreszenz der einzelnen Stämme auf.

Bei den vier Stunden alten Kulturen färbten sich mit dem markierten γ -Globulin zwölf Stämme genauso gut wie der Referenzstamm an. Sieben Stämme fluoreszierten etwas schwächer.

Nach fünf Stunden fluoreszierten fünfzehn Stämme so stark wie der Referenzstamm und vier Stämme färbten sich etwas schwächer.

3.2.1.2. Beurteilung der Aussprossung

Von den zwanzig untersuchten Stämmen sproßten sieben Stämme gleich schnell wie der Referenzstamm aus. Elf Stämme, also über die Hälfte, wuchsen langsamer als der Referenzstamm. Nur ein Stamm wuchs schneller.

3.2.1.3. Beurteilung der Kolonieform

Die Beurteilung der Kolonieform erwies sich als außerordentlich schwierig, weil alle Übergänge auftauchten. Daraus ergab sich, daß dieser Beurteilung ein hoher Grad von Subjektivität anhaftete.

Bei den vier Stunden alten Kulturen konnte bei siebzehn Stämmen gesagt werden, daß die jungen Kulturfäden in gerader Richtung wuchsen.

Bei zwei Stämmen waren die Fäden schon leicht gewunden.

Bei den fünf Stunden alten Kulturen wurde die Beurteilung noch schwieriger. Die Mehrzahl der Stämme lag jetzt in einer gewundenen Wachstumsform vor. Dabei bildeten die Stämme Nr. 3 und Nr. 12 schon große Schleifen. Bei sechs Stämmen konnte man sagen, daß sie noch gerade wuchsen.

3.2.2.Andere Aerobe Sporenbildner

3.2.2.1.Beurteilung der Färbung

Hinsichtlich der Fluoreszenz war zwischen den vier und fünf Stunden alten Kulturen kein Unterschied festzustellen.

Bei *Bacillus cereus*, Nr. B1-B4, färbten sich in allen Fällen die Sporen mit an. Bei Nr. B2 und B4 war auch eine diffuse Fluoreszenz dort festzustellen, wo die vegetativen Formen zu vermuten waren. Die Konturen der Kolonien traten aber nicht deutlich hervor. Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Nummer B14, *B.pantothenticus*. So traten insgesamt drei Fälle auf, die außer einer deutlichen Sporenfluoreszenz auch eine diffuse unspezifische Fluoreszenz der vegetativen Anteile aufwiesen.

Außer bei B1 und B3 fluoreszierten nur die Sporen bei B5, *B.megaterium* und B19, *B.circulans*.

Alle übrigen 13 Stämme zeigten keine wahrnehmbare Fluoreszenz der vegetativen Anteile und der nicht ausgekeimten Sporen.

3.2.2.2. Beurteilung von Aussprossung und Kolonieform

Aussprossung und Kolonieform waren nicht zu beurteilen, weil deren Anfärbung zu schwach war. Lediglich bei B2 waren ganz schwache Andeutungen abzulesen, deren Größe auf ein schnelleres Wachstum schließen ließ, als es bei *B.anthraxis* auftritt.

Andere Untersuchungen mit einem gegen *B. cereus* gerichteten Konjugat bestätigten diese Vermutung.

TABELLE IV

EINZELERGEBNISSE DER BEURTEILUNG DER MILZBRAND-
BAZILLENPRÄPARATE.KONJUGAT AUS SERUM NR.7; ZEIT: 4 h

NR.	FÄRBUNG	AUSSPROSSUNG	MIKRO- KOLONIEFORM	BEMERKUNGEN
1	+++	+	gerade	-
2	+++	+	gerade	Referenzstamm
3	+++	+	gerade	-
4	++	-	gerade	wächst sehr langsam
5	+++	+	gerade	-
6	+++	-	gerade	-
7	+++	-	gerade	-
8	++	-	gerade	-
9	++	-	gerade	-
10	+++	-	gerade	-
11	+++	+	gerade	-
12	+++	+	leicht gewunden	-
13	+++	+	gerade	-
14	++	-	gerade	-
15	+++	+	gerade	-
16	++	-	gerade	-
17	+++	-	leicht gewunden	-
18	++	-	gerade	-
19	++	-	gerade	-
20	+++	+	gerade	-

(Erläuterung siehe unter 3.1.10.)

TABELLE V

EINZELERGEBNISSE DER BEURTEILUNG DER MILZBRAND-
BAZILLENPRÄPARATE. KONJUGAT AUS SERUM NR.7; Zeit: 5 h

NR.	FÄRBUNG	AUSSPROSSUNG	MIKRO- KOLONIEFORM	BEMERKUNGEN
1	+++	$\frac{+}{-}$	leicht gewunden	-
2	+++	$\frac{+}{-}$	leicht gewunden	Referenzstamm
3	+++	+	Schleifen	-
4	+++	$\frac{+}{-}$	leicht gewunden	-
5	+++	$\frac{+}{-}$	leicht gewunden	-
6	+++	-	gerade	-
7	+++	-	leicht gewunden	-
8	++	-	gerade	-
9	+++	-	gerade	-
10	+++	-	gerade	-
11	+++	$\frac{+}{-}$	leicht gewunden	-
12	++	$\frac{+}{-}$	Schleifen	-
13	+++	$\frac{+}{-}$	leicht gewunden	-
14	+++	-	gerade	-
15	+++	$\frac{+}{-}$	leicht gewunden	-
16	+++	-	leicht gewunden	-
17	+++	-	leicht gewunden	-
18	++	-	leicht gewunden	-
19	++	-	gerade	-
20	+++	$\frac{+}{-}$	leicht gewunden	-

(Erläuterung siehe unter 3.1.10.)

TABELLE VI

EINZELERGEBNISSE DER BEURTEILUNG ANDERER AEROBER
SPORENBILDNER. KONJUGAT AUS SERUM NR.7; ZEIT: 4 + 5 h

NR.	FÄRBUNG	AUSSPROSSUNG	MIKRO- KOLONIEFORM	ART
B1	--	Nicht zu er- kennen	Nicht zu er- kennen	B.cereus
B2	-	"	"	B.cereus
B3	--	"	"	B.cereus
B4	-	"	"	B.cereus
B5	--	"	"	B.megaterium
B6	---	"	"	B.megaterium
B7	---	"	"	B.subtilis
B8	---	"	"	B.subtilis
B9	---	"	"	B.subtilis
B10	---	"	"	B.subtilis
B11	---	"	"	B.badius
B12	---	"	"	B.pumilus
B13	---	"	"	B.laterosporus
B14	-	"	"	B.pantothenticus
B15	---	"	"	B.polymyxa
B16	---	"	"	B.licheniformis
B17	---	"	"	B.macerans
B18	---	"	"	B.coagulans
B19	--	"	"	B.circulans
B20	---	"	"	B.lentus
B21	---	"	"	B.firmus

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.1. FLUORESZENZ VON B. ANTHRACIS

Über 50 % der untersuchten Stämme färbten sich nach vier Stunden (Tabelle IV) gleich gut wie der Referenzstamm. Alle Kulturen, die sich schwächer färbten, waren S-Stämme, jedoch war der Intensitätsunterschied nicht sehr groß. Es ist auffallend, daß bei den fünf Stunden alten Kulturen (Tabelle V) eine bessere Anfärbung festzustellen war. Das zeigt eine Parallele zu den Beobachtungen von KUZMIN 1968 (43), der für junge Kulturen die indirekte F.A.-Methode empfiehlt. Unterschiedliche Reaktionen in verschiedenen Wachstumsperioden waren auch von FRANEK und KUBIN 1967 (30) für das "antikapsuläre Konjugat" festgestellt worden. Doch sei noch einmal darauf hingewiesen, daß die Intensitätsunterschiede nicht groß waren und bei der an sich schon geringen Lichtintensität eine optische Täuschung nicht unmöglich ist.

4.2. AUSSPROSSUNG VON B. ANTHRACIS

Die Beurteilung der Aussprossung erwies sich in allen Fällen als am leichtesten. Nur ein Stamm wuchs schneller als der Referenzstamm. Über die Hälfte der untersuchten Stämme wuchsen langsamer als dieser. Alle drei R-Stämme (1,3 und 13) wuchsen gleich schnell (Tabellen IV und V), wie der NP-1/R-Stamm. Allerdings ist das Material zu klein, um eine statistisch stichhaltige Aussage in der Richtung zu treffen, daß alle R-Stämme schneller wachsen als die

S-Formen. Aus den Beobachtungen von THORNE 1960 (66) ist aber zu erwarten, daß es so ist. Wie aus den Tabellen IV und V zu entnehmen ist, konnte jedoch nicht bei allen S-Stämmen (Tabelle II) ein langsames Wachstum beobachtet werden. Das könnte allerdings daran liegen, daß einige Stämme schon dissoziiert vorlagen, und die Kettenlänge nur vergleichend geschätzt und nicht exakt gemessen wurde. So besteht die Möglichkeit, daß bei Gemischen der Gesamteindruck entschied und kleinere Unterschiede, die primär nach der Fragestellung nicht beurteilt werden sollten, untergingen.

4.3.KOLONIEFORM VON B.ANTHRACIS

Die Erwartungen, die sich an die Beurteilung der Kolonieform knüpften, die ja von der Grundfragestellung her das zweite diagnostische Kriterium sein sollte, wurden nicht ganz erfüllt. Als streng genommen gerade konnten nur einige ganz wenige Ketten beurteilt werden. Deshalb fielen unter die Beurteilung "gerade" auch solche Ketten, bei denen die Grundrichtung des Wachstums ungebrochen war; kleine Ausbuchtungen wurden unberücksichtigt gelassen. Ferner muß berücksichtigt werden, daß das Fixationsverfahren nicht optimal ist. Es besteht die Möglichkeit, trotz größter Behutsamkeit Bakterienketten zu lösen, wenn die Präparate gespült werden. Auf ein stärkeres Ansaugen auf dem Filter-

halter wurde verzichtet, um das von FEY 1970 (26) beschriebene Einsaugen der Bakterien in den Filter und die daraus resultierende Zerstörung der Kettenstruktur zu vermeiden. Allerdings stellte sich im Laufe der Untersuchungen heraus, daß eine Beurteilung der Kolonieforn in diesem Falle nicht notwendig war, weil sich erwies, daß die Spezifität der Konjugate höher war als erwartet.

4.4.FÄRBUNG DER ANDEREN AEROBEN SPORENBILDNER

Aufgrund der unerwartet hohen Spezifität des Konjugates waren die Färbungsunterschiede zwischen *B.anthraxis* und allen anderen aeroben Sporenbildnern, die untersucht wurden, deutlich. Allerdings kann bei der geringen Anzahl der ausgewählten Stämme die statistische Aussagekraft bezweifelt werden. Eine weiträumig angelegte statistische Untersuchung ginge jedoch über den Rahmen der auf prinzipielle Klärung ausgerichteten Arbeit hinaus. Jedoch läßt die Klarheit der Unterschiede zwischen *B.anthraxis* und den anderen untersuchten aeroben Sporenbildnern, die zwei Beurteilungsstufen, von ++ bis - umfaßten, (Tabellen IV, V und VI) erwarten, daß die praktische Verwendbarkeit dieses Testes nicht wesentlich eingeschränkt werden muß. Aus den Ergebnissen läßt sich ebenfalls eine nahe Verwandtschaft von *B.anthraxis* zu *B.cereus* ablesen. Überraschend ist, daß

B. panthothenticus ebenfalls eine leichte Antigenverwandtschaft zum Milzbrandbazillus zeigt. Es fällt auf, daß die Affinität des Konjugates zu den Sporen sehr hoch ist. Die Fluoreszenz der nicht ausgekeimten Sporen im Präparat war oft von gleicher Intensität wie die der vegetativen Zellen. Selbst bei den mit (-) beurteilten heterologen Arten war die Sporenfluoreszenz deutlich. Somit drängt sich die Vermutung auf, daß es in vegetativen Milzbrandzellen Antigene gibt, die den Sporen verschiedener aerober Sporenbildner gemeinsam sind. Vermutlich ist das der Grund, daß gegen Sporen gerichtete Konjugate, wie das von HANSEN (36), nicht spezifisch waren, denn es ist außerordentlich schwer, Sporenantigene herzustellen, die frei von vegetativen Anteilen sind.

4.5. BEMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

Der Vorteil des Verfahrens ist außer in seiner Schnelligkeit darin zu sehen, daß immer eine Vergleichsmöglichkeit in Form des Referenzstammes vorhanden ist. Das erleichtert die Beurteilung der Präparate. Wegen der durch die Bearbeitung entstehenden hohen Verdünnung der Konjugate, die die Gefahr einer unspezifischen Fluoreszenz vermindert, ist die positive Fluoreszenzintensität nur als mäßig zu bezeichnen. Aus diesem Grunde sollten nur hochspezifische Seren verwendet werden, darüber hinaus ist

eine gut eingestellte, optisch hochwertige Einrichtung die Arbeitsvoraussetzung.

Bei diesem Verfahren wird ein Konjugat verwendet, das sich von den bisher benutzten unterscheidet (Tabelle I). Es wurde nämlich aus einem Immuns serum gewonnen, das nur gegen vegetative, unbekapselte Milzbrandbakterienzellen gerichtet war. Das geschah deshalb, weil bei Verwendung des Antigens nach CHERRY und FREEMAN 1959 (15), das ein Gemisch verschiedener vegetativer Formen mit Sporen ist, die Möglichkeit der Unspezifität des Serums besteht. Zudem hatten FRANEK und KUBIN 1967 (30) ein großes Spektrum von Reaktionsmöglichkeiten für dieses "antikapsuläre" Serum beschrieben. Aus den unbekapselten, vegetativen Zellen ließ sich dagegen in den vorliegenden Untersuchungen ein sauberes, definiertes Antigen herstellen. Die damit gewonnenen Konjugate färbten auch die S-Stämme ohne nennenswerten Intensitätsverlust an (Tabellen IV und V). Darüber hinaus bietet die Verwendung von Membranfiltern als Kolonieträger die Möglichkeit zur Rationalisierung der Arbeitsweise, weil der Schritt der Anreicherung der Bakterien aus der Flüssigkeit nach DANIELSON 1965 (23) mit dem eigentlichen Nachweis kombiniert werden kann. Zudem besteht die Möglichkeit, bei Unsicherheit in der Beur-

teilung der Fluoreszenzintensität, durch Vergleich mit dem Kontrollausstrich und durch die Beurteilung der Kolonieform, die Diagnose zu stützen.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es möglich ist, Mikrokolonien von Milzbrandbazillen im Alter von 4-5 Stunden auf fluoreszenzfreien Membranfiltern fluoreszenzserologisch nachzuweisen. Dabei wurden zwanzig Stämme von *B. anthracis* mit einundzwanzig Stämmen anderer aerober Sporenbildner verglichen.

Das Konjugat wurde aus einem Serum hergestellt, das gegen vegetative Anteile des NP 1/R Vollumstammes, ATCC 14185, gerichtet war. Das mit FITC konjugierte γ -Globulin wurde mittels Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie gereinigt.

Bei jedem Präparat wurde neben dem untersuchten Stamm eine Sporensuspension des Referenzstammes aufgebracht. Dadurch entstand eine Vergleichsmöglichkeit für das Wachstum und die Färbung, die die Beurteilung erleichterte. Die Beurteilung der Form der Mikrokolonien, die als zweites Kriterium mit herangezogen wurde, erwies sich bei der Verwendung von hochspezifischen Konjugaten als nicht notwendig.

Die Ergebnisse zeigen, daß sämtliche Milzbrandbazillenstämme sich in der Intensität der Anfärbung deutlich von den anderen aeroben Sporenbildnern abhoben.

Die Methode ermöglicht eine Milzbranddiagnose innerhalb fünf bis sechs Stunden.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ASCOLI, A. und VALENTI, E. Biologische Milzbranddiagnose.
Zschr. Inf. krkh. Haustiere, 7,
375 (1910)
2. AMIES, C. R. The use of topically formed
calcium alginate as a depot
substance in active immunisation.
J. Path. Bact., 77, 435-442 (1959)
3. BARBER, M. und
KUPER, S. W. A. Identification of Staphylococcus
pyogenes by the phosphatase reaction.
J. Path. Bact., 63, 65-68 (1951)
Seventh edition
4. BERGEY MANUAL OF DETER- The Williams Wilkins Company
MINATIVE BACTERIOLOGY Baltimore (1957)
5. BIBEL, DIE Exodus 9, 3-10 (2. Buch Mose) Zit.
Klemm und Klemm, J. Am. Vet. Med. Ass.
135, 458-462 (1959)
6. BIEGELEISEN, J. Z. The demonstration of Bacillus
CHERRY, W. B., SKALLY, P.
MOODY, M. D. anthracis in environmental species
by conventional and fluorescent
antibody technique.
Am. J. Hyg. 75, 230-239 (1962)
7. BIEGELEISEN, J. Z. Immunofluorescent staining of
Bacillus anthracis in dried beef.
J. Bakt. 88, 260-261 (1964)
8. BRACHMAN, P. S. und
PEELEY, J. C. Manual of Clinical Microbiology
Chapter 13, Bacillus Anthracis
(1970)
9. BROWN, E. R. und
CHERRY, W. B. Specific identification of
Bacillus anthracis by means of
a variant bacteriophage.
J. Infect. Dis. 96, 34-39 (1955)

10. BUSYGIN, K. F. Eine verbesserte Technik zum Gebrauch des Nachweises von fluoreszierenden Antikörpern zum Schnellaufweis von Anthraxbazillen in Erde und Wasser. Uchen. zap. Kazan. vet. Inst. 84 65-68 & 69-73. Ref: Vet. Bulletin 34, abstr. 12
11. CARTER, C. H. und LEISE, J. M. Specific staining of various bacteria with a single fluorescent antiglobulin. J. Bact. 76, 152-154 (1958)
12. CHADWICK, P. Rapid screening test for Bacillus anthracis. Canad. J. Microbiol. 9, 734-737 (1963)
13. CHARISOW, S. C. Eine Methode zum Nachweis von Bacillus anthracis im Boden und im Wasser. N.E.-Baumann-Institut für Veterinärmedizin, Kazan. Übersetzung beim Verfasser
14. CHASE, MERRIL W. Methods in Immunology and Immunochemistry I. Academic Press; S 202 (1967)
15. CHERRY, W. B. und FREEMAN, E. M. Staining bacterial smears with fluorescent antibody, V: The rapid identification of B. anthracis in culture and in human and murine tissues. Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 175, 582-597 (1959)
16. CHERRY, W. B. Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable diseases. U.S. Dep. of Health, Public Health Service, CDC, Atlanta/Ga. S. 29 (1960)

17. CHERRY, W.B. und
MOODY, M.D. Fluorescent antibody techniques
in diagnostic bacteriology.
Bact. Rev. 29, 241-242 (1965)
18. CLARK, H.F. und
SHEPARD, C.C. A dialysis technique for
preparing fluorescent antibody.
Virology 20, 642-644 (1963)
19. COHN, F. Untersuchungen über Bakterien II
Beiträge zur Biologie der
Pflanzen 1
Heft 2, 141-204 (1875)
20. CONRADI, H. Über ein neues Prinzip der
elektiven Züchtung und seine
Anwendung bei Diphtherie.
Münchener Med. Wochenschrift 20,
1073-1074 (1913)
21. COONS, A.H., CREECH,
H.J. und JONES, R.N. Immunological properties of an
antibody, containing a fluorescent
group.
Proc. Soc. Exp. Biol. 47, 200-202 (1941)
22. COONS, A.H. und
KAPLAN, M.H. Localisation of antigen in tissue
cells II: Improvements in a method
for the detection of antigens by
the means of fluorescent antibody.
J. Exp. Med. 90, 1-13 (1950)
23. DANIELSSON, D. A membrane filter method for the
demonstration of bacteria by the
fluorescent antibody technique.
1. A methodological study.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 63,
597-603 (1965)
24. DANIELSSON, D.
und LAURELL, G. A membrane filter method for the
demonstration of bacteria by the
fluorescent antibody technique.
2. Application of the method for the
detection of small numbers of
bacteria in water.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 63
604-608 (1965)

- 25.FEY,H. Fluoreszenzmikroskopische
Technik Vortrag, gehalten zur
1. Herbsttagung der europäischen
Arbeitsgemeinschaft der Veterinär-
pathologen in Bern. (1970)
- 26.FEY,H. Schnelldachweis von Keimen mittels
der Immunofluoreszenzmethode.
Ein Bericht über die experimentellen
Arbeiten vom 1.1.1970-31.12.1970
am Vet.-Bakt.-Inst. der Universität
Bern (1970)
- 27.FISCHER,A. Zur Systematik der Bakterien.
I.Vorschläge zur Nomenclatur.
Jahrbuch für wissenschaftliche
Botanik 27,131-162 (1895)
- 28.FORTNER,J. Die Mikroskopie der aeroben und
anaeroben Oberflächenkolonien auf
hängendem Agar.
Zbl.Bakt.Abt.I Orig. 115,96-99 (1929)
- 29.FRANEK,J. Use of fluorescent antibodies for
the rapid diagnosis of infection,
caused by B.anthraxis and
P. tularensis.
J.Hyg.Epidemiol.,Microbiol. and
Immunolog.9, 160-168 (1965)
- 30.FRANEK,J. und Some properties of so called anti-
KUBIN,V. capsular sera used in the immuno-
fluorescent reactions with
capsules of Bacillus anthracis.
J.Hyg.Epidemiol.,Microbiol.,and
Immunolog.11,315-319 (1967)
- 31.GOLDMAN,M. und Preserving fluorescein isocyanate
CARVER,R.K. for simplified preparation of
fluorescent antibody.
Science, 126, 839-840 (1957)

32. GORDON, M.A.,
EDWARDS, M.R. und
TOMPKINS, V.N. Refinement of fluorescent
antibody by gel filtration.
Proc.Soc.Exp.Biol. and Med.
109, 96-99 (1962)
33. GUTHRIE, R.K. und
REEDER, D.J. Membrane filter fluorescent
method for detection and
enumeration of bacteria in water.
Appl.Microbiol.17, 399-401 (1969)
34. IVANOVICS, G. und
FÖLDES, J. Problems concerning the
phylogenesis of Bacillus anthracis.
Acta Microbiol.Hung.5, 89-109 (1958)
35. JENSEN, J. und
KLEEMEYER, H. Die bakterielle Differential-
diagnose des Anthrax mittels eines
neuen spezifischen Testes, Perl-
schnurtest.
Zbl.Bakt.Abt.I.Orig.159, 494 (1952)
36. HANSEN, P.A. Zit.nach 16
37. JOST, R. Versuche zur Erzeugung von Bakterien-
aerosolen und zu deren Untersuchung
mit spezieller Berücksichtigung der
Immunofluoreszenztechnik.
Phil.nat.Diss.Bern (1970)
38. JOUBERT, L.,
BUISSIÈRE, L. und
CHIROC, C. Chimotypes de Bacillus anthracis
enquêtes épidémiologiques.
Soc.Sci.et de Med.Comp., Lyon, 70,
159-171 (1968)
39. KAMPPELMACHER, E.H. De betekenis van de methode der
"fluorescerende antilichamen" bij
de miltvuurdiagnose.
T.Diergeneesk.85, 1802-1811 (1960)

40. KNIGHT, J.G. und
PROOM, H. A comparative survey of the
nutrition and physiology of
mesophilic species in the
genus bacillus.
J.Gen.Microbiol.4, 508-538 (1950)
41. KUBIN, V. und
FRANEK, J.K. K metodice pouziti vajecnych
zloutku pri immunofluorescencni
diagnostice antraxu
Cs.Epidemiol., Microbiol., and
Immunolog.3, 152-154 (1970)
42. KUJUMGIEFF, J. Giorn.Batt.Immun.Torino, 20, 1010 (1938)
Zit.nach 62
43. KUZMIN, N.A. Detecting Anthrax bacteria in
forage using the fluorescent
antibody method.
Veterinariya, 2, 111-114 (1968) (russ.)
44. LEVINA, E.N. Fluorescein-labelled antibody for
the detection of the anthrax
bacillus. Report I.
Zhur.Microbiol., Epidemiol., i
Immunbiol.29, 9-15 (1958) (russ.)
45. LOVELOCK, D.W. und
DAVIES, A. A fluorescent antibody technique
for the rapid detection of
salmonellae in foodstuffs.
J.of the Roy.Microsc.Soc.87,
35-38 (1967)
46. LÜTJE, F. Beobachtungen über Milzbrandvor-
kommnisse im stader Niederelbe-
gebiet. D.T.W.44, 719 (1936)
47. MARSHALL, J.D.,
EVELAND, W.C. und
SMITH, C.W. Superiority of fluoresceinisothio-
cyanate for fluorescent antibody
technique with a modification of
its application.
Proc.Soc.Exp.Biol.and Med.98,
898-900 (1958)

48. Mc.CLOY, E.W. Studies on a lysogenic bacillus strain I.A bacteriophage, specific for *Bacillus anthracis*.
J.Hyg.49, 114-125 (1951)
49. NAIRN, R.C. Fluorescent Protein Tracing.
Third edition, E&S Livingstone Ltd.,
Edinburgh and London. (1969)
50. PETERSON, E.A.
 und SOBER, H.A. Diethylaminoethylcellulose
Biochemical Preparations.
Ed.Meister; Wiley, New York and
London, 8, 39-42 (1961)
51. PETERSON, E.A.
 und SOBER, H.A. Column chromatography of proteins:
substituted celluloses.
Methods in Enzymology, 5, 3-27
Academic Press, New York (1962)
52. PITZURRA, M. Microculture per strisco
Schweiz.Zeitschr.Path.Bakt.17,
561-564 (1954)
53. PITZURRA, M. Ricerche sulla sporulazione del
B.subtilis e del *B.anthraxis*.
Schweiz.Zeitschr.Path.Bakt.17,
565-574 (1964)
54. POETSCHKE, G.,
 UEHLEKE, H. und
 KILLISCH, L. Untersuchungen mit fluoreszenz-
markierten Antikörpern; V.Gleich-
zeitiger Nachweis mehrerer Anti-
gene durch verschieden gefärbte
fluoreszierende Antikörper am
Beispiel von *Proteus morganii* und
Bacillus cereus.
Schweiz.Zeitschr.Path.Bakt.22,
758-765 (1959)

55. PURZISS, M. und
WRIGHT, G. G. Studies on immunity in Anthrax:
IV. Factors influencing elaboration
of protective antigen of Bacillus
anthracis in chemically defined
media.
J. Bakt. 68, 474-482 (1954)
56. REISHER, J. I. Anal. Biochem. 26, 178 (1968)
Zit. nach Serva Katalog 1970
57. RIGGS, J. C. Master Thesis, Univ. of Kansas (1957)
Zit. nach 47
58. RIGGS, J. C.,
LOH, P. C. und
EVELAND, W. C. A simple fractionation method for
preparation of fluorescein labeled
 γ -globulin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105
655-658 (1960)
59. ROLLE, M. und
MAYR, A. Mikrobiologie und allgemeine Seuchen-
lehre. Dritte Auflage. S. 214
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1966)
60. SAWARSIN, S. W. Die Feststellung des Milzbrand-
regers an einigen Umweltobjekten.
Wojen. Med. J. 4, 78-79 (1963) (russ.)
61. SCHAPLOWA, M. F. Zur Methodik der Aussonderung von
Milzbrandregern aus dem Boden.
Zhur. Microbiol., Epidemiol. i Immun.
1, 144 (1966) (russ.)
62. SEIDEL, G. Die aeroben Sporenbildner unter
besonderer Berücksichtigung des
Milzbrandbazillus.
Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie
1, Ambrosius Barth Verlag, Leipzig
(1963)

63. SLJACHOV, E.N.
und GRUZ, E.V. Die Erprobung von Methoden zur Laboratoriumsdiagnostik des Milzbrandes und zur Identifizierung des Erregers. Zhur. Microbiol. Epidemiol. i Immun. 10, 52-55 (1967) (russ.)
64. SMITH, N.R., GORDON, R.E.
und CLARK, F.E. Aerobic sporeforming bacteria. Agricultural Monograph, 16 Washington (1952)
65. SOKOL, A.
KOPPEL, Z.
HRUSOVSKY, F. Neue Möglichkeiten einer schnellen Differenzierung von nichtverkapselten Vakzine- und virulenten B.anthraxis Stämmen. Fol. Veterin. 11, 91-97 (1967) (Cs)
66. THORNE, C.B. Biochemical properties of virulent and avirulent strains of B.anthraxis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 88, 1024-1033 (1960)
67. TOPLEY,
und WILSON, G.S. Principles of Bacteriology and Immunity, 5th edition, 2, 2082-2084 Edward Arnold Ltd. London (1966)
68. ULBRICH, F. Mikrokultur der Bakterien und ihre Bedeutung für die bakteriologische Praxis, Lehre und Forschung. Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 162, 479-486 (1954)
69. ULBRICH, F. Vitalfärbung der Dissoziationsformen von Bakterienkulturen in der Mikro- und Makrokultur. Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 169, 221-223 (1957)
70. WALKER, P.D. und
BATTY, I. Surface antigenic changes in B.cereus during germination and sporulation as shown by fluorescent staining. J. Appl. Bact. 28, 194-196 (1965)
71. WYATT, P.J. Differential light scattering, a physical method for identifying living bacterial cells. Appl. Optics 7, 1879-1896 (1968)

7. A N H A N G

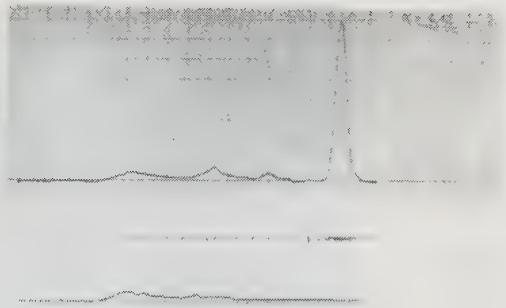


Abb. 1 GEWINNUNG VON γ - GLOBULIN (Elektrophoretische Auftrennung auf Acetatfolien)

- a. Obere Kurve: Auftrennung von unbearbeitetem Kaninchenserum
- b. Untere Kurve: Auftrennung der mit Ammonium-sulfat ausgefällten Serumfraktion

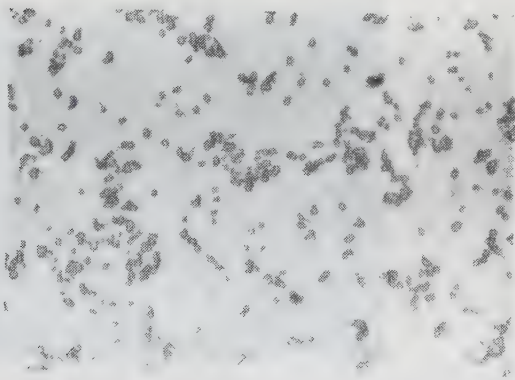


Abb. 2 ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN SPORENSUSPENSION

Die Reinigung erfolgte nach der hier modifizierten Methode nach CONRADI. (Färbung nach RAKETTE)

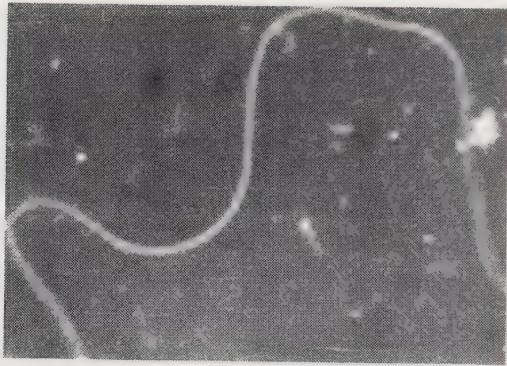


Abb. 3 MILZBRANDMIKROKOLONIE, LEICHT GEWUNDEN (AUSSCHNITT)

Die Anfärbung erfolgte mit dem Konjugat Nr.7



Abb. 4 MILZBRANDMIKROKOLONIE, GERADE

Die Anfärbung erfolgte mit dem Konjugat Nr.7

Nach Beendigung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof.Dr. Strauch für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung danken, ebenso bin ich Herrn Prof.Dr. Schliesser, Giessen, für die Übernahme der Arbeit zur Vorlage bei dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität, Giessen, zu Dank verpflichtet. Herrn Prof.Dr. Fey, Bern, verdanke ich die Einarbeitung in die fluoreszenz-serologische Technik und Dr. Francine Tanner, Lausanne, Prof.Dr. Sokol, Kosice, Prof.Dr.Blobel, Giessen, sowie Prof.Dr. Großklaus, Berlin, möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung der für die Versuche benötigten Bakterienstämme danken. Herzlich gedankt sei auch allen Mitarbeitern der Abteilungen Tierhygiene I und Tierhygiene II der Universität Hohenheim, die mich bei der Durchführung der Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

LEBENS LAUF

Am 22.12.1943 wurde ich in Berlin geboren.
Meine Eltern sind Max Böhm, Ingenieur und
Elisabeth Böhm, geb. Prill, Sekretärin.
Vom 1.9.1949 bis zum 31.3.1955 besuchte ich
die 9. Grundschule in Berlin 20. 1955 erfolgte
dann meine Umschulung in die Wolfgang-Borchert-
Schule, O.T.Z., Berlin 20, die ich bis 1959
besuchte. In diesem Jahr wechselte ich in die
Hans-Carossa-Schule, O.W.Z., im gleichen Stadt-
bezirk über, an der ich 1963 das Abitur machte.

Im Sommersemester 1963 begann ich an der Justus-
Liebig-Universität Giessen das Studium der
Veterinärmedizin, das ich im November 1969
mit dem Staatsexamen abschloß.

In der anschließenden Zeit, bis zum Juni 1970,
war ich an verschiedenen Orten der Bundesrepublik
als Praxisvertreter tätig. Von diesem Termin an
bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Lehrstuhl für Tierhygiene, Leiter: Prof.Dr.Strauch,
an der Universität Hohenheim angestellt.

